

**ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH CHIẾT CÂY DỪA CẠN (*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON) QUA THỨC ĂN LÊN HOẠT TÍNH CỦA MEN TRAO ĐỔI PHỐT PHÁT TRONG HUYẾT TƯƠNG VÀ SỨC KHÁNG KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA* Ở CÁ TRÔI (*LABEO ROHITA* HAM.) GIỐNG**

*Nguyễn Thị Thanh Thủy*  
Viện Hải Dương Học (Nha Trang)

**TÓM TẮT** Cá Trôi giống (*Labeo rohita* Ham.) ăn thức ăn có chứa dịch chiết cây Dừa Cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) với liều lượng 10, 20 và 30 ml/100g thức ăn, tương ứng với các lô xử lý là T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> và T<sub>3</sub>. Sau 3 tuần, mẫu máu cá ở các lô thí nghiệm được thu để xác định hoạt tính của men trao đổi phốt phát (alkaline phosphatase (ALP) và acid phosphatase (ACP)) trong huyết tương. Sau đó các lô cá được tiêm chủng với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* chết (xử lý formol 1%). Sau hai tuần tiêm chủng, tất cả các lô cá được gây cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila* sống. Kết quả cho thấy dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) qua thức ăn đã ảnh hưởng đáng kể ( $P < 0,05$ ) tới hoạt tính men trao đổi phốt phát ALP trong huyết tương của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.). Hoạt tính cả hai men trao đổi phốt phát ALP và ACP trong huyết tương biến động đáng kể sau khi cá được tiêm chủng và nhiễm khuẩn *A. hydrophila*. Ở nồng độ 10 và 20 ml/100g thức ăn (T<sub>1</sub> và T<sub>2</sub>), hiệu quả của dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) lên sức kháng khuẩn *A. hydrophila* ở Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) không rõ ràng ( $P > 0,05$ ). Khi nồng độ tăng lên 30 ml/100g thức ăn (T<sub>3</sub>), dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Don đã ức chế sức kháng khuẩn của cá xử lý.

**EFFECT OF *CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON EXTRACT DIET ON PLASMA PHOSPHATASE ACTIVITIES AND DISEASE RESISTANCE TO *AEROMONAS HYDROPHILA* IN ROHU (*LABEO ROHITA* HAM.) FINGERLINGS**

*Nguyen Thi Thanh Thuy*  
Institute of Oceanography (Nha Trang)

**ABSTRACT** Rohu fingerlings (*Labeo rohita* Ham.) were fed on plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don extract diet with varying doses of 10, 20 and 30 ml/100g feed, corresponding to treated groups, namely T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub>. After three weeks, blood was collected from all groups for testing of plasma alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP). Then, all groups were immunized with 1% formalin-killed *Aeromonas hydrophila*. After two weeks of immunization, all groups were challenged with live *A. hydrophila*. The results indicated that plasma ALP activity significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in *C. roseus* extract treated fish. After immunization and infection these enzyme activities considerably fluctuated. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) in disease resistance against *A. hydrophila* infection between the control and T<sub>1</sub> (10 ml/100 g feed) and T<sub>2</sub> (20 ml/100 g feed) groups. In contrast, the disease resistance against *A. hydrophila* infection in T<sub>3</sub> (30 ml/100 g feed) group decreased clearly.

## I. MỞ ĐẦU

Hoạt tính của một số men trao đổi photphat (alkaline phosphatase (ALP) và acid phosphatase (ACP) trong huyết tương cũng như một số cơ quan như gan, thận của cá thường phản ánh tình trạng sức khỏe của cơ thể và liên quan tới sự tổn thương tế bào. Sự thay đổi hoạt tính của men là chỉ số để đánh giá chức năng hoạt động của gan (Mukhopadhyay, 1987). Khi cơ thể bị sốc, hoạt động trao đổi photphat trong mô tế bào tăng, dẫn đến hoạt tính của men trao đổi photphat cũng tăng (Sastry và Sharma, 1980). Chất kích thích hệ miễn dịch có nguồn gốc thực vật đang được dùng ngày càng nhiều hơn trong phòng các bệnh nhiễm khuẩn cho tôm cá nuôi, bởi chúng rẻ tiền, dễ áp dụng, lại không gây tác dụng phụ như thường gặp khi dùng kháng sinh và vắc xin sống (Siwicki và cộng sự, 1994; Mulero và cộng sự, 1998). Cây Dừa Cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don; tên tiếng Anh là Vinca hay Madagascar periwinkle), thuộc họ Trúc Đào

(Apocynaceae), là loài cây phổ biến ở vùng nhiệt đới. Theo kinh nghiệm dân gian, rễ Dừa Cạn có tác dụng tẩy giun, chữa sốt; thân và lá dùng chữa một số bệnh ngoài da và tiểu đường. Cây Dừa Cạn có tới 150 loại hoạt chất alkaloid, trong đó có 2 loại quan trọng là vinblastin và vincristin được dùng trong điều trị bệnh máu trắng và ung thư (Noble, 1990; Renault và cộng sự, 1999). Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) là một trong những loài cá nước ngọt tăng trưởng nhanh và có sức sinh sản lớn, đang được nuôi khá phổ biến ở nhiều nước Châu Á. Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy dịch chiết cây Dừa Cạn tăng cường hoạt động thực bào ở Cá Chép (*Cyprinus carpio*) (Kumar, 2001) và tăng sức kháng khuẩn *E. tarda* ở Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) (Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2005). Thí nghiệm này nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) qua thức ăn lên hoạt tính của men trao đổi photphat ALP và ACP trong huyết tương và sức kháng khuẩn *Aeromonas hydrophila* ở Cá Trôi giống (*Labeo rohita* Ham.).



Hình 1: Cây Dừa Cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)  
Vinca or Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

## II. TÀI LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Chuẩn bị dịch chiết thô và thức ăn thí nghiệm:

50 g lá cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) (Hình 1) tươi được rửa sạch, xay nhuyễn và ngâm trong dung dịch gồm 100

ml cồn 90<sup>0</sup> và 100 ml nước cất, để qua đêm ở nhiệt độ 4<sup>0</sup>C. Dung dịch này được li tâm (200vòng/phút) trong 2 phút và lọc qua giấy lọc Whatman. Dịch chiết thô này được dùng với các liều lượng 10, 20 và 30 ml/100 g thức ăn thường. Thức ăn được trộn đều, tạo sợi, sấy khô ở nhiệt độ dưới 60<sup>0</sup>C và bảo quản trong túi nilông hàn kín

(Kumar, 2001) để dùng trong quá trình thí nghiệm.

## 2. Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn *A. hydrophila*:

Dòng thuần chủng *A. hydrophila* được nuôi cấy trong môi trường Triptone Soya Broth (TSB) sau 24 giờ, li tâm và pha loãng trong dung dịch đệm (Phosphat Buffer Saline (PBS)), đo với mật độ quang phổ (OD) 0,5 ở bước sóng 540 nm, sau đó đếm lại số tế bào bằng phương pháp tráng đĩa (Sahoo và Mukherjee, 2001b). Dung dịch *A. hydrophila* dùng để tiêm chủng được xử lý qua đệm với dung dịch formol 1%.

## 3. Thu mẫu máu:

Máu được rút từ tĩnh mạch đuôi của cá thí nghiệm với chất chống đông là heparin (Sigma, Diagnostics). Mẫu máu (10 cá/lô) sau khi rút được li tâm ngay (10.000 vòng/phút) ở nhiệt độ 4°C trong vòng 15 phút. Huyết tương được tách ra và bảo quản ở nhiệt độ - 20°C cho đến khi phân tích.

## 4. Hoạt tính men trao đổi photphat (Alkaline phosphatase và acid phosphatase):

Hoạt tính men trao đổi photphat ALP và ACP ( $\mu\text{mol}$  para-nitrophenol giải phóng ra/mg đạm/phút) được xác định bằng phương pháp Garen và Levinthal (1960) với 3 lần lặp lại. Mật độ quang phổ (OD) được đo ở bước sóng 420 nm trên máy AR 601 - Analyser, Glaxo Qualisystems.

## 5. Sức kháng khuẩn *A. hydrophila* của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.):

Sức kháng khuẩn *A. hydrophila* của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) được xác định bằng phương pháp của Reed và Muench (1938) với một liều vi khuẩn *A. hydrophila* có thể gây chết 50% cá thí nghiệm sau khoảng thời gian 7 ngày. Phần trăm sống sót tương đối (relative percent survival: RPS) được xem như sức kháng

khuẩn của cá thí nghiệm đối với vi khuẩn *A. hydrophila*.

$$RPS = \left(1 - \frac{T}{N}\right) \times 100 \text{ (Logambal và}$$

cộng sự, 2000).

Với T: tỷ lệ tử vong của các lô cá thí nghiệm.

N: tỷ lệ tử vong của lô cá được tiêm nước muối sinh lý.

## 6. Bố trí thí nghiệm:

Cá Trôi giống (*Labeo rohita* Ham.) ( $35 \pm 2$  g) được chia ngẫu nhiên thành các lô riêng biệt (10 cá/lô, với 2 lần lặp lại): Lô đối chứng ăn thức ăn bình thường và các lô xử lý, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> và T<sub>3</sub>, được ăn thức ăn có chứa dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Đơn với các nồng độ tương ứng là 10, 20 và 30 ml/100 g thức ăn. Sau 3 tuần thí nghiệm, máu cá ở các lô được thu để xác định hoạt tính của các men photphat ALP và ACP. Sau đó cá được tiêm chủng ở màng bụng với một liều ( $10^6$  tế bào/cá) dung dịch vi khuẩn *A. hydrophila* chết (xử lý bằng formol 1%). Hoạt tính các men này được kiểm tra định kỳ hàng tuần. Sau 2 tuần tiêm chủng, các lô cá được gây nhiễm với dung dịch vi khuẩn *A. hydrophila* sống ( $10^6$  tế bào/cá). Tỷ lệ tử vong của các lô cá được theo dõi hàng ngày. Hoạt tính của các men ALP và ACP được xác định ở cá sống sót sau 1 tuần gây nhiễm.

## 7. Xử lý số liệu:

Dùng phương pháp Student T- test ( $P < 0,05$ ) để so sánh sự khác nhau có ý nghĩa giữa các lô thí nghiệm.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Hoạt tính men ALP và ACP trong huyết tương của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.):

Theo Hrubec và Smith (1999), dùng huyết tương (plasma) để phân tích các chỉ tiêu sinh hóa của máu sẽ cho kết quả chính xác hơn vì có thể ly tâm để tách huyết tương ngay sau khi rút máu, trong khi đó huyết thanh (Serum) thường bị ảnh hưởng

bởi quá trình phá hủy hồng cầu (hemolysis). Do vậy trong nghiên cứu này, huyết tương đã được sử dụng để xác định hoạt tính của các men trong máu cá.

Men Alkaline phosphatase (ALP) và Acid phosphatase (ACP) là hai loại men trao đổi phốt phát, thường có trong huyết tương và dịch tế bào của một số cơ quan chức năng của cá như gan, thận, tụy v.v. Men ALP có tính kiềm và men ACP có tính acid. Hoạt tính của hai loại men này có liên hệ chặt chẽ tới quá trình trao đổi phốt phát và sự tổn thương tế bào. Sự thay đổi hoạt tính của hai loại men ALP và ACP là chỉ số để đánh giá chức năng hoạt động của gan (Mukhopadhyay, 1987). Bởi vậy hoạt tính của chúng cũng là chỉ số để đánh giá tình trạng sức khoẻ của cơ thể cá. Theo Shaikh và Hiradhar (1988) sự ức chế của hoạt tính men ACP trong thận của loài

mudskipper, *Boleophthalmus dentatus* có thể là do sự phá vỡ màng tế bào. Sự ức chế hoạt tính men ALP có thể gây nên sự phá vỡ hệ thống màng trao đổi chất của tế bào (Lakshmi và cộng sự, 1991) và có thể coi như sự thích nghi của cá khi bị sốc (Shaikila và cộng sự, 1993). Trong thí nghiệm này, sau 3 tuần cá được ăn thức ăn có dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Don, hoạt tính men ALP trong huyết tương ở tất cả các lô cá xử lý giảm đáng kể ( $P < 0,05$ ) so với lô đối chứng. Tuy nhiên, không có sự khác nhau đáng kể ( $P > 0,05$ ) hoạt tính men ACP trong huyết tương giữa lô đối chứng và các lô xử lý (Bảng 1). Kết quả này có thể giả thuyết rằng dịch chiết cây *C. roseus* (L.) G. Don, thông qua thức ăn, đã ảnh hưởng đến quá trình trao đổi phốt phát trong máu cá, dẫn đến hoạt tính men ALP trong máu của các lô cá xử lý bị giảm.

**Bảng 1: Hoạt tính men phốt phát ALP và ACP ( $\mu\text{mol}$  của para-nitrophenol phosphate giải phóng/mg đạm/phút) trong huyết tương của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.)**  
**Plasma ALP and ACP activity in Rohu (*Labeo rohita* Ham.)**

Lô thí nghiệm	Sau 3 tuần thí nghiệm	Sau 1 tuần tiêm chủng	Sau 2 tuần tiêm chủng	Sau 1 tuần cảm nhiễm
	Alkaline phosphatase (ALP)			
Đối chứng	$15,2^a \times 10^{-3}$	$23,6^a \times 10^{-3}$	$23,0^{ac} \times 10^{-3}$	$23,1^a \times 10^{-3}$
T <sub>1</sub>	$14,4^b \times 10^{-3}$	$22,8^b \times 10^{-3}$	$23,1^a \times 10^{-3}$	$22,1^b \times 10^{-3}$
T <sub>2</sub>	$13,5^c \times 10^{-3}$	$13,8^{ab} \times 10^{-3}$	$14,1^b \times 10^{-3}$	$22,9^a \times 10^{-3}$
T <sub>3</sub>	$14,1^{bc} \times 10^{-3}$	$13,3^{ab} \times 10^{-3}$	$22,7^c \times 10^{-3}$	$22,1^b \times 10^{-3}$
Acid phosphatase (ACP)				
Đối chứng	$1,0368^a \pm 0,013$	$1,0268^a \pm 0,009$	$2,0209^a \pm 0,010$	$1,0356^a \pm 0,056$
T <sub>1</sub>	$1,0345^a \pm 0,027$	$1,20267^a \pm 0,005$	$2,0220^a \pm 0,004$	$2,0239^b \pm 0,027$
T <sub>2</sub>	$1,0461^b \pm 0,022$	$1,20371^b \pm 0,034$	$2,0260^b \pm 0,013$	$2,0261^b \pm 0,012$
T <sub>3</sub>	$1,0351^a \pm 0,027$	$1,0325^b \pm 0,011$	$2,0212^a \pm 0,021$	$1,20273^{ab} \pm 0,047$

- Các lô thí nghiệm mang ký tự mũ khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) (Student's t - test).

- Các lần thu mẫu mang số ký hiệu dưới khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) (Student's t - test).

Sau khi cá được tiêm chủng và gây nhiễm, hoạt tính của cả hai loại men ALP và ACP trong huyết tương ở cả lô đối chứng và các lô cá xử lý biến động đáng kể. Điều này cho thấy sự tiêm chủng và nhiễm khuẩn đã ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của các men trao đổi phốt phát

trong máu cá. Theo Das và Mukherjee, 1998, có hiện tượng hoại tử và giãn cấu trúc các ống dẫn của thận ở cá *Catla catla* khi cá bị nhiễm khuẩn *A. hydrophila*. Trong thí nghiệm này, sự biến động đáng kể hoạt tính men ALP và ACP trong huyết tương sau khi cá được tiêm chủng và gây

nhiễm khuẩn có thể liên quan tới sự biến đổi cấu trúc mô tế bào gan và thận của cá thí nghiệm (kết quả của tác giả chưa công bố). Mặt khác điều này có thể coi như sự thích nghi của cá khi bị sốc do tiêm chủng và nhiễm khuẩn *A. hydrophila* gây ra.

## 2. Sức kháng khuẩn *A. hydrophila* của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.):

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) tăng cường hoạt động thực bào ở Cá Chép (*Cyprinus carpio*) (Kumar, 2001) và tăng sức kháng khuẩn *E. tarda* ở Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) (Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2005). Tuy nhiên trong thí nghiệm này, không có sự khác nhau đáng kể về phần trăm sống sót tương đối (RPS) giữa lô đối chứng và 2 lô xử lý T<sub>1</sub> và T<sub>2</sub> (Bảng 2). Kết quả này cho thấy hiệu quả của dịch chiết cây *C. roseus* (L.) G. Don thông qua thức ăn lên sức kháng khuẩn *A. hydrophila* ở Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) không rõ ràng như trường hợp cá bị nhiễm khuẩn *E. tarda* (Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2005). Điều này có thể giả thuyết rằng

hiệu quả của chất kích thích hệ miễn dịch đối với từng loài cá không những phụ thuộc vào liều lượng và phương pháp áp dụng nó mà còn phụ thuộc vào tác nhân gây bệnh ở cá.

Một số nghiên cứu cho thấy hiệu quả của chất kích thích hệ miễn dịch không tăng tỷ lệ thuận với nồng độ sử dụng nó, ngược lại ở nồng độ cao nó có thể ức chế hoạt động miễn dịch của cá (Philip và cộng sự, 2001, Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2005). Ngoài ra, Murugan và cộng sự (1999) cho rằng dịch chiết thô của *C. roseus* (L.) G. Don rất độc đối với ấu trùng *Spodoptera litura*. Kết quả từ bảng 2 cho thấy phần trăm sống sót tương đối của lô xử lý T<sub>3</sub> lại thấp hơn cả lô đối chứng và hai lô xử lý T<sub>1</sub> và T<sub>2</sub>. Điều này có thể giả thuyết rằng ở lô xử lý T<sub>3</sub>, dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Don qua thức ăn có thể ảnh hưởng đến sức khỏe cá xử lý. Tuy nhiên, liều lượng gây chết của dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Don đối với Cá Trôi giống (*Labeo rohita* Ham.) vẫn chưa được khẳng định trong thí nghiệm này.

Bảng 2: Tỷ lệ tử vong và phần trăm sống sót tương đối của Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.)  
Mortality rate and relative percent survival of Rohu (*Labeo rohita* Ham.)

Lô thí nghiệm	Cá thí nghiệm	Tỷ lệ tử vong hàng ngày của cá thí nghiệm sau khi gây nhiễm khuẩn <i>A. hydrophila</i>							Phần trăm sống sót (%)
		1	2	3	4	5	6	7	
N	10 x 2	8	6	0	0	0	0	0	-
ĐC	10 x 2	4	4	0	2	0	0	0	28,57
T <sub>1</sub>	10 x 2	2	1	2	4	0	0	0	35,71
T <sub>2</sub>	10 x 2	0	1	4	5	0	0	0	28,57
T <sub>3</sub>	10 x 2	4	3	2	3	0	0	0	14,29

N: Nước muối sinh lý

## IV. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) qua thức ăn đã ảnh hưởng đáng kể tới hoạt tính men trao đổi photphat ALP trong huyết tương của Cá Trôi giống (*Labeo rohita* Ham.). Hoạt tính cả hai men trao đổi photphat ALP và

ACP trong huyết tương biến động đáng kể sau khi cá được tiêm chủng và nhiễm khuẩn *A. hydrophila*.

Ở nồng độ 10 và 20 ml/100g thức ăn, hiệu quả của dịch chiết cây Dừa Cạn (*C. roseus* (L.) G. Don) lên sức kháng khuẩn *A. hydrophila* ở Cá Trôi (*Labeo rohita* Ham.) không rõ ràng. Ngược lại, ở nồng độ

30 ml/100g thức ăn, dịch chiết *C. roseus* (L.) G. Don đã ức chế sức kháng khuẩn của cá xử lý. Kết quả này phù hợp với giả thuyết rằng hiệu quả của chất kích thích hệ miễn dịch đối với từng loài cá không những phụ thuộc vào liều lượng và phương pháp áp dụng nó mà còn phụ thuộc vào tác nhân gây bệnh ở cá.

## V. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành nhờ học bổng của chương trình “Hợp tác trao đổi văn hóa giữa Việt Nam và Ấn Độ (ICCR). Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới TS. Mukherjee, Viện trưởng Viện Giáo Dục Nghề Cá (CIFE), Mumbai, Ấn Độ, về sự hướng dẫn tận tâm và nghiêm khắc của thầy; tới PGS. TSKH, nguyên Viện trưởng Nguyễn Tác An cùng tập thể bạn bè, đồng nghiệp phòng Công nghệ Nuôi trồng, Viện Hải dương học, về sự động viên, hỗ trợ cả về vật chất và tinh thần trong suốt thời gian tôi học tập tại Ấn Độ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Das B. K. & S. C. Mukherjee, 1998. Symptomatology and histopathology of epizootic ulcerative syndrome in Rohu, *Labeo rohita* (Ham.).
2. Garen A. & C. A. Levinthal, 1960. Fine-structure genetic and chemical study of the enzyme Alkaline Phosphatase of *E. coli*. I. Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 38: 470.
3. Hrubec T. C. & S. A. Smith, 1999. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias, and hybrid striped bass. *J. Aquatic Animal Health*, 11 (2): 116-122.
4. Kumar N. K., 2001. Effect of certain plant extracts on immune system of *Cyprinus carpio*. M.F.Sc. Dissertation. Submitted to Cent. Ins. Fish. Edu., CIFE (Deemed University) Mumbai, India. p. 38.
5. Lakshmi R., R. Kundu, E. Thomas & A. Mansuri, 1991. Mercuric chloride induced inhibition of acid and alkaline phosphatase activity in the kidney of mudskipper, *Boleophthalmus dentatus*. *Acta Hydrochim. Hydrobiologia*, 19 (3): 341-344.
6. Logambal S. M., S. Venkatalakshmi & R. Dinakaran Michael, 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*, 430 (1- 3):113 -120.
7. Mukhopadhyay M. K., B. B. Ghosh, H. C. Joshi & M. M. Bagchi, 1987. Biomonitoring of pollution in Hooghly estuary using *Rita rita* as test fish. *J. Environ. Biology*, 8 (4): 259 –306.
8. Mulero V., M. A. Esteban, J. Munoz & J. Mesequer, 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 49 – 62.
9. Murugan K., R. Babu. and S. Sivaramakrishnan, 1999. Toxic effect of plants on *Spodoptera litura* Fab. *Insect Environment*, 4 (4): 135.
10. Noble R. L., 1990. The discovery of the vinca alkaloids - chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem. Cell Biol.*, 68: 1344 - 1351.
11. Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2005. Hiệu quả của dịch chiết cây *Catharanthus roseus* (L.) G. Don qua thức ăn đến một số hoạt động miễn dịch không xác định và sức kháng khuẩn *Edwardsiella tarda* ở cá Rohu (*Labeo rohita* Ham.) giống. Bộ Thủy Sản: Hội Thảo Ngành 11/2004, Vũng Tàu.
12. Philip R., K. Sreekumar, A. Anas & I. S. Bright Singh, 2001. Immunostimulants - Source, diversity,

- commercial preparations and mode of application. Natl. workshop on aquaculture medicine, p.74.
13. Reed L. J., & M. Muëench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American J. Hygiene, 27: 493 - 497.
  14. Renault J. H., J. M. Nuzillard, G. L. Croue'rour, The'penier, M. Z. Hanrot, and L. M. Olivier, 1999. Isolation of Indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode.
  15. Sahoo P. K. & S. C. Mukherjee, 2001. Immunosuppressive effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in Indian major car (*Labeo rohita*). Comp. Immunol. Microbiol. Infectious Dis., 24: 143 - 149.
  16. Sastry K. V. & K. Sharma, 1980. Diazinon effect of the activities of brain enzymes from *Channa punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24: 326 – 332.
  17. Shaikh Y. A. & K. Hiradhar, 1988. Alterations in the acid and alkaline phosphatase quantities in fluoride - exposed estuarine goby, *Boleophthalmus dussumieri*. Fluoride, 21(3): 131-136.
  18. Shaikila B. I., Thangavel, & M. Ramaswamy, 1993. Adaptive trends in tissue acid and alkaline phosphatases of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) under sevin toxicity. Indian J. Environ. Health, 35 (1): 36-39.
  19. Siwicki A. K., D. P. Anderson, & G. L. Rumsey, 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol., 41: 125 - 139.

Người phản biện:

- TS. Nguyễn Văn Lục
- TS. Trương Sĩ Kỳ